

FRUCTIFICATION D'UN *SCUTELLINIA* (DISCOMYCÈTE) EN CULTURE IN VITRO, EN PRÉSENCE DE BACTÉRIES

par J.P. SCHRANTZ*

RÉSUMÉ. — Le *Scutellinia umbrarum* (Fr.) Lamb. a été obtenu en culture *in vitro*. Il ne produit des apothécies normales et des chlamydo-spores qu'en présence de deux bactéries appartenant aux genres *Aeromonas* et *Arthrobacter*. La lumière est indispensable, la température optimale est voisine de 25°. Les premiers stades du développement du filament ascogonial sont décrits.

SUMMARY. *Scutellinia umbrarum* (Fr.) Lamb. has been obtained in culture *in vitro*. Normal apothecia and chlamydo-spores are produced only in the presence of two bacteria: *Aeromonas* sp., *Arthrobacter* sp. Light is indispensable, optimum temperature is towards 25°. The first developmental stages of ascogonial filament are described.

Les Ascomycètes et particulièrement les Discomycètes qui fructifient en culture sont rares. Parmi les *Scutellinia* une seule espèce a produit des apothécies en culture: le *Lachnea scutellata* (L.) Gill. (= *Scutellinia scutellata* (L. ex Fr.) Lambotte) qui a été isolé et cultivé par GWYNNE-VAUGHAN et WILLIAMSON (1933). Plus récemment, BERTHET (1964) a obtenu quelques germinations des spores du *S. hirta* et d'autres espèces mais le mycélium est mort rapidement. Cet auteur, qui a cultivé de nombreuses espèces de Discomycètes, n'a obtenu de fructifications que de celles qui dans la nature, sont lignicoles ou carbonicoles. C'est pourquoi il est arrivé à la conclusion que certains groupes naturels sont rebelles à la culture *in vitro*: dans ceux-ci, dont les *Scutellinia* font partie, la germination des spores et le bouturage sont impossibles ou exceptionnels.

* Université Paris VI - UER 59, Laboratoire de Biologie végétale, 77300 Fontainebleau.

A partir de sporées obtenues sur lames stériles nous avons pu isoler trois espèces différentes de *Scutellinia*. L'une d'entre elles produit régulièrement en culture *in vitro*, depuis trois ans, dans certaines conditions que nous avons précisées, des apothécies normales et en même temps des chlamydo-spores.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Origine de la souche et techniques de culture

Le matériel ayant servi de souche était constitué par quelques apothécies apparues sur des fragments de bois en décomposition, mêlés à du terreau, dans une serre chaude.

La sporée est recueillie sur une lame de verre stérilisée à la flamme disposée au-dessus d'une apothécie, en atmosphère saturée d'humidité, près d'une source de lumière. Les spores sont repiquées immédiatement sur le milieu de culture. Les ensemencements, toujours plurispores, sont effectués en fioles d'erlenmeyer de 100 ml sur des milieux à 2 ou 3% d'extrait de malt solidifiés par de l'agar-agar à raison de 2 ou 3%. Certaines fioles de culture sont choisies à col large pour permettre de planter dans le milieu une lame porte-objets en position subverticale. On réalise ainsi des cultures sur lames qui facilitent les observations microscopiques. L'incubation est réalisée soit simplement à la température ambiante du laboratoire près d'une fenêtre, soit dans une étuve REALIS réglée à $25^{\circ} \pm 1^{\circ}$. La lumière y est fournie par des tubes fluorescents PHILIPS type «blanc industrie» et la photopériode est de 12 heures.

Techniques cytologiques

Les cultures sur lames ainsi que les spores ont été colorées directement sans fixation par le bleu coton ou par l'hématoxyline acéto-ferrique de WITTMAN (1965). Par ailleurs des fragments de milieu portant de jeunes apothécies ont été fixés par le liquide de Navaschine ou de Bouin et inclus à la paraffine. Puis les coupes ont été colorées par l'hématoxyline ferrique ou par le bleu alcian/rouge nucléaire solide suivant BENES et KAMINEK (1973).

RÉSULTATS

Germination des spores

La germination est très irrégulière. Dans l'eau à 22° , entre lame et lamelle, elle débute, dans les cas les plus favorables, après 24 heures, par l'émission d'un tube germinatif en un point quelconque; le premier septum apparaît tardivement. Parfois il faut attendre 10 jours pour qu'elle ait lieu. Dans les sporées fraîchement récoltées le taux de germination est toujours plus élevé que dans les sporées anciennes. Ce fait peut s'expliquer soit par la mort rapide des spores soit par leur entrée progressive dans un état de dormance.

Évolution des cultures

A partir de la sporée d'origine plusieurs ensemencements ont été réalisés. Certains ont produit un mycélium pur qui est resté stérile, et d'autres un mycélium contaminé par des bactéries, mais produisant de nombreuses apothécies et des chlamydospores au bout de 2 à 3 mois. De ces dernières cultures deux souches bactériennes* ont pu être isolées et rapportées l'une au g. *Aeromonas* l'autre au g. *Arthrobacter*. En ajoutant au milieu des antibiotiques (Pénicilline + Streptomycine), nous avons pu séparer le mycélium des souches fertiles des contaminations et constater qu'il devient stérile en l'absence de bactéries.

La lumière s'est révélée indispensable. En l'obscurité absolue, les cultures demeurent stériles mais le mycélium se développe normalement et produit de nombreuses fructifications 10 jours après le retour à la lumière. La lumière continue empêche également la reproduction. Nous n'avons pas pour le moment précisé les limites, mais avons seulement reconnu qu'un éclairage de 500 lux, sous photopériode de 12 h., donne de bons résultats.

La température est également importante: 25° semble être un optimum pour la production d'apothécies. Enfin les tentatives faites pour cultiver ce champignon sur un milieu synthétique avec diverses sources de carbone (glucose, galactose, maltose, lévulose, inuline, amidon) et diverses sources d'azote (NO₃K, peptone) n'ont pas abouti pour l'instant: la croissance du mycélium est nulle sur ces milieux. Seul l'extrait de malt (à des doses variant entre 1 et 4% donne d'excellents résultats.

Par ailleurs nous avons constaté que les cultures pures d'*Aeromonas* sont beaucoup moins développées que celles dans lesquelles la bactéries est mêlée au champignon.

Caractères morphologiques et cytologiques

Nous ne décrivons que les cultures fertiles, c'est-à-dire celles où le champignon est mêlé aux bactéries.

1) Le mycélium

A partir de l'inoculum le mycélium et la colonie bactérienne se développent simultanément mais le premier s'étend plus rapidement à la surface du milieu tandis que les bactéries forment, en retrait, une colonie saillante, humide, muqueuse, plus ou moins circulaire, de 2mm de hauteur. Sa couleur varie du beige clair à la périphérie, à l'orange à l'intérieur. La première couleur est due à l'*Aeromonas* la seconde à l'*Arthrobacter* qui contient des pigments vraisemblablement caroténoïdes. Avant que la reproduction n'ait lieu, la surface du milieu est totalement envahie par la colonie bactérienne, le mycélium poursuit son développement sur les parois du récipient et sur la lame porte objet plantée dans le milieu. Aucun mycélium aérien n'émerge de la colonie.

* Nous remercions ici M. le Professeur J. RIVIERE de l'Institut national agronomique de Paris-Grignon, qui a bien voulu identifier nos souches bactériennes.

Le mycélium développé sur la lame est formé d'hyphes larges (7-20 μ m), renflées, ramifiées; les articles sont courts, ils contiennent de minuscules gouttelettes lipidiques riches en pigments caroténoïdes, particulièrement abondantes au voisinage des fructifications. Les articles sont plurinucléés. Les parois épaisses sont toujours accompagnées, sur leur face externe, de nombreuses bactéries (*Aeromonas* uniquement) qui semblent trouver là un substrat favorable. Dans le substrat le mycélium est peu développé; par contre il est très dense dans la colonie bactérienne et les hyphes dressées parallèlement y prennent l'aspect d'une palissade (fig. 1). La colonie bactérienne semble formée, outre les bactéries, par un réseau de très fines fibrilles polysaccharidiques acides. Des cultures pures d'*Aeromonas* et d'*Arthrobacter* nous ont montré que c'est le premier qui constitue ce réseau et qui donne à la colonie son aspect saillant, humide et muqueux.

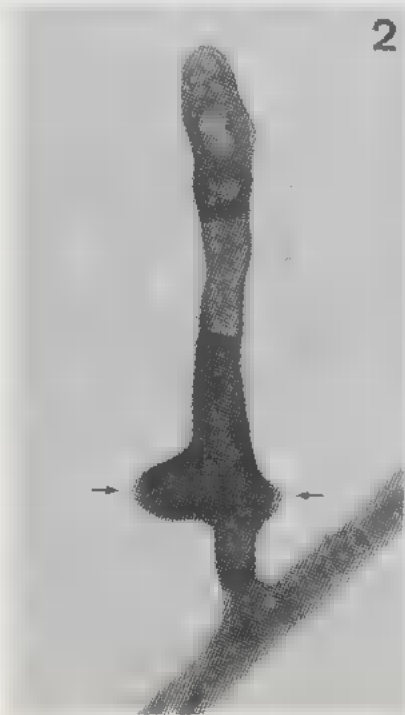
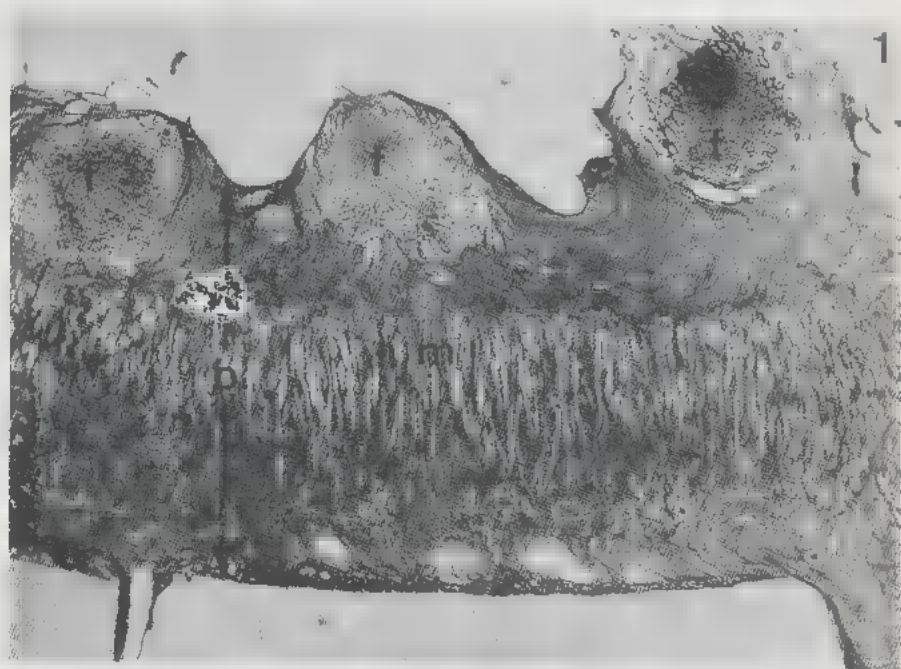
2) Les filaments ascogoniaux

Les fructifications parfaites se développent aussi bien sur les parois du récipient que dans la partie supérieure de la colonie bactérienne. Sur lame nous avons pu suivre l'apparition et les premiers stades de l'évolution des filaments ascogoniaux. Ceux-ci apparaissent sur des ramifications courtes de 3 articles qui deviennent identifiables dès que la cellule basale ou pied émet des rameaux latéraux (fig. 2). Par la suite cette cellule basale se cloisonne en 2 ou 3 cellules qui produisent à leur tour des ramifications très denses, masquant progressivement la base du filament ascogonial (fig. 3), tandis que la partie médiane qui comprend jusqu'à sept cellules, et l'extrémité réduite à une cellule, demeurent libres et sont particulièrement sidérophiles (fig. 4). Sur des préparations vitales ces deux parties du filament ascogonial se distinguent du reste car leur cytoplasme est riche en globules lipidiques caroténifères. La suite du développement n'a pas été étudiée dans le présent travail. Il convient néanmoins de noter qu'aucun rapprochement ni fusion des cellules ascogoniales avec un autre filament n'ont été observés.

3) Les chlamydospores

Le mycélium produit toujours au voisinage des ascogones des ramifications simples, ou elles-mêmes ramifiées, de 2 ou 3 articles (fig. 5). Le dernier article de chaque rameau se renfle, accumule des réserves et épaissit sa paroi. Il devient finalement une spore ovoïde de 25 x 35 μ m dont la paroi épaisse de 2 μ m est

Pl. I. — Fig. 1: Coupe dans une culture âgée de 9 semaines: la colonie bactérienne (b), épaisse d'environ 1mm, est vivement colorée par le bleu alcian, le mycélium (m) y est formé par de nombreuses hyphes dressées, de jeunes fructifications (f) se développent en surface. Dans le substrat (s) les hyphes sont très rares. Fixation FAA, coloration: bleu alcian/rouge nucléaire solide, G = 50 x. — Fig. 2: Jeune filament ascogonial naissant latéralement sur une hyphe. La cellule basale émet deux ramifications (flèches). Culture sur lame, coloration bleu coton. G = 600 x. — Fig. 3: Filament ascogonial dont la base est enveloppée par les nombreux filaments recouvrants qu'elle a produits, seules la partie médiane et l'extrémité sont libres. Culture sur lame, coloration bleu coton. G = 400 x.



ornée de nombreuses verrues de $2 \times 3-5 \mu\text{m}$ (fig. 7). Cette spore contient des globules lipidiques caroténifères, du glycogène et de nombreux noyaux. C'est une chlamydospore (cf. discussion) qui apparaît aussi bien sur lame qu'au niveau du mycélium submergé dans la colonie bactérienne. Nous n'avons pu obtenir sa germination.

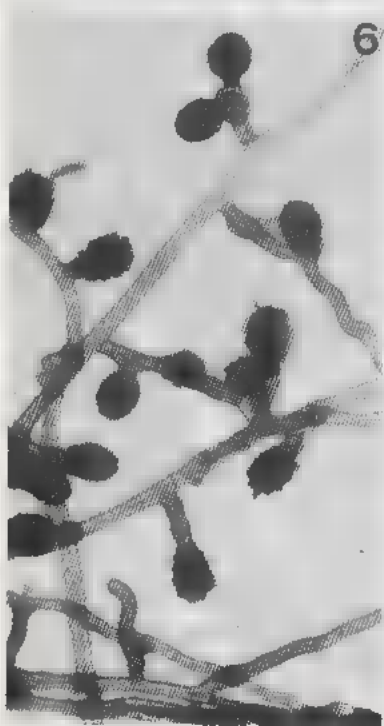
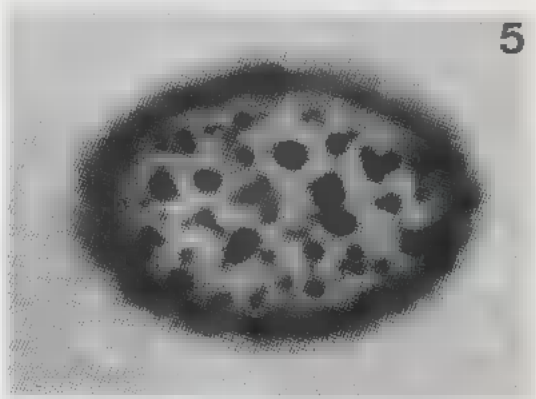
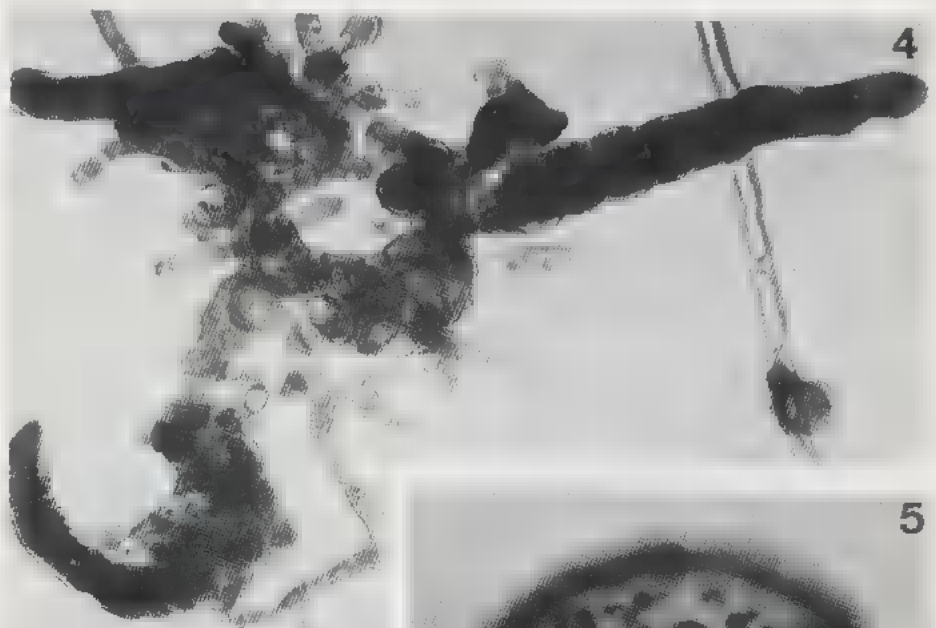
DISCUSSION ET CONCLUSIONS

Identification du champignon

L'identification des espèces du genre *Scutellinia* est particulièrement délicate. LE GAL (1966) attribue ces difficultés «à leur très grande variabilité et à la subtilité de leurs caractères différentiels». Cet auteur a effectué une révision de plusieurs espèces et a été suivie par SVRCEK (1971) puis MORAVEC (1974). A la lumière de ces travaux nous avons rapporté notre espèce au *S. umbrarum* (Fr.) Lamb. dont le type est l'échantillon de l'Herbier de BOUDIER et dont les caractères différentiels sont : poils larges et courts 400 à $600 \mu\text{m}$ (rarement 800 à 1000), spores courtement elliptiques, largement arrondies aux pôles, ornées de pustules grossières souvent très inégales, presque toujours isolées, $17-26 \times 13-20,5 \mu\text{m}$. LE GAL ne l'a jamais récolté sur le bois, toujours sur la terre humide. MORAVEC (1971-1974) a créé deux espèces qui ne diffèrent du type que par la dimension des spores : *S. pseudoumbrarum* Mor. et *S. parvispora* Mor. Celles des spores de l'espèce que nous cultivons ($17-19-21,8 \times 10-12-14$) (fig. 5) s'inscrivent dans les limites du type. Ajoutons que les caractères et les dimensions des échantillons obtenus après 3 ans de culture, sont les mêmes que ceux de la souche.

Quant aux spores de reproduction asexuée, elles sont comparables à celles qu'on observées GWYNNE-VAUGHAN et WILLIAMSON (1933) chez le *Scutellinia scutellata* mais celles-ci ont une paroi lisse et ne sont pas pédicellées. Comme ces auteurs nous les considérons comme des chlamydospores car elles en possèdent les caractères qu'on leur reconnaît généralement (GRIFFITHS, 1974) : ce sont des spores produites de façon asexuée pouvant résulter d'une modification d'un article d'hyphes végétative, possédant une paroi épaisse, souvent verruqueuse, dont la strate interne est imprégnée de substances hydrophobiques et dont la fonction est essentiellement d'assurer la pérennité et non la dissémination. Ici leur rôle apparaît ambigu puisqu'elles se forment dans

Pl. II. - Fig. 4: Bouquet de 3 filaments ascogoniaux coloré par l'hématoxyline de WITTMAN; le cytoplasme des cellules axiales est particulièrement sidérophile. G = 340 x. - Fig. 5: Ascospore colorée au bleu coton; l'ornementation est constituée par des pustules grossières, inégales, isolées. G = 3400 x. - Fig. 6: Hyphes produisant, sur des ramifications, une ou plusieurs chlamydospores. Culture sur lame colorée au bleu coton. G = 200 x. - Fig. 7: Détail des chlamydospores: la paroi épaisse et sombre à maturité est ornée de hautes verrues. Culture sur lame colorée au bleu coton. G = 500 x.



les mêmes conditions que les apothécies mais néanmoins leur structure ne permet pas de les considérer autrement.

L'appareil ascogonial

Classiquement le filament ascogonial des Discomycètes operculés comprend 3 parties : une partie basale, le pied, une partie médiane ou ascogoniale, une partie terminale effilée, le trichogyne (CHADEFAUD, 1960, DELATTRE-DURAND et PARGUEY-LEDUC, 1979). Le filament ascogonial du *Scutellinia umbrarum* ne s'éloigne guère de ce type, néanmoins son extrémité réduite à une seule cellule plus longue mais non effilée, peut être interprétée comme un trichogyne avorté et non fonctionnel puisqu'aucun contact avec d'autres filaments n'a été observé.

Problèmes posés par la culture

Le fait que le mycélium en culture pure reste stérile et qu'il fructifie en présence des bactéries *Arthrobacter* et *Aeromonas*, indique de façon évidente que celles-ci exercent une action stimulante sur les reproductions sexuée et asexuée.

Des cas semblables de champignons ayant besoin pour leur fructification de micro-organismes ont déjà été rencontrés. PARK et AGNIHORTI (1969) ont montré l'action stimulante de plusieurs bactéries du sol et notamment d'un *Arthrobacter* sur la production de carpophores par l'*Agaricus bisporus*. FONTANA (1971) a envisagé la possibilité d'une association entre le mycélium du *Tuber melanosporum* et de 2 bactéries saprophytes (dont un *Arthrobacter*). L'importance de cette association a été retenue pour améliorer les conditions de la trufficulture (GRENTE, 1973). Cependant le mode d'action des micro-organismes ■ rarement été précisé. En ce qui concerne l'*Agaricus bisporus*, COUVY (1974) se demande si c'est en libérant des métabolites qu'ils induisent la fructification ou bien si c'est au contraire en absorbant des produits du métabolisme du champignon qui inhibent la fructification. Selon STANEK (1972) l'*A. bisporus* utiliserait préférentiellement des polysaccharides bactériens. Ce fait a été confirmé par EDDY et JACOBS (1976).

LASIK et coll. (1979) ont isolé plusieurs espèces de Bactéries, dont un *Agrobacterium*, qui accompagnent le *Gaeumannomyces graminis* dans la rhizosphère du blé. Ils ont montré que le mycélium du champignon pousse mieux sur un milieu contenant des polysaccharides bactériens (glucanes, mannoglucanes, et galactomannoglucanes) que sur des solutions de glucose de même concentration, ou qu'en présence des polysaccharides extraits de la surface des racines du blé.

Mais il est probable que le rôle des bactéries n'est pas limité à l'apport glucidique. BROWN (1977) a montré l'effet des vitamines produites par les bactéries de la rhizosphère sur l'apparition de la maladie causée par le *G. graminis*.

Pour ce qui concerne le *Scutellinia umbrarum* que nous cultivons, nos premières observations, qui montrent que le mycélium et les fructifications sont

particulièrement abondants au sein de la colonie muqueuse (formant un réseau polysaccharidique) produite par l'*Aeromonas*, permettent d'attribuer un rôle certain à ces métabolites bactériens, sans que l'on puisse pour le moment exclure l'action de vitamines. Par ailleurs le fait que l'*Aeromonas* se fixe sur les parois du champignon et croisse davantage en sa présence peut être l'indice de l'existence d'une association à bénéfices réciproques entre les deux organismes. D'autres recherches, en cours, visant à mettre au point un milieu synthétique, permettront d'apporter des éléments de réponse à ces questions.

BIBLIOGRAPHIE

- BENES K. et KAMINEK M., 1973 — The use of nuclear Fast Red in Plant material successively with Alcian Blue. *Biologia Plant.* 15 : 294-297.
- BERTHET P., 1964 — Essai biotaxinomique sur les Discomycètes. Thèse Doct. d'État Sc. nat., Lyon, 159 p.
- BROWN M.E., 1977 — Effect of vitamin on infection by *Gaeumannomyces graminis*. Rothamsted Report 1976. Part 1, 283.
- COUVY J., 1973-1974 — Les facteurs de fructifications des Agaricales et plus particulièrement de l'*Agaricus bisporus* (Lange) Sing. *Le Botaniste* 56: 103-128.
- CHADEFAUD M., 1960 — Traité de Botanique systématique. I. Les végétaux non vasculaires (Cryptogamie), 1018 p. Masson, Paris.
- DELATTRE-DURAND F. et PARGUEY-LEDUC A., 1979 — Développement et structure de l'apothécie d'*Anthracobia nitida* (Discomycète operculé). *Bull. Soc. myc. Fr.* 95: 355-375.
- EDDY B.P. et JACOBS L., 1976 — Mushroom compost a nutrient source for *Agaricus bisporus*. *Mushroom J.* 38: 56.
- FONTANA A., 1971 — Le mycélium de *Tuber melanosporum* en culture pure. *Allionia* 17: 19-23.
- GRENTE J., 1973 — Rapport final du coordinateur sur les recherches exécutées dans le cadre du contrat «amélioration des conditions de la trufficulture». DGRST, 7371256 Fr.
- GRIFFITHS D.A., 1974 — The origin, structure and function of chlamydospores in Fungi. *Nova Hedwigia* 25: 503-547.
- GWYNNE-VAUGHAN H.C.I. et WILLIAMSON H.S., 1933 — The asci of *Lachnea scutellata*. *Ann. Bot.* 47: 375-382.
- LASIK J., STANEK M., VANCURA V. et WURST M., 1979 — Effect of bacterial polysaccharides on the growth of *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* and wheat roots. *Folia microbiol.* 24 : 262-268.
- LE GAL M., 1966 — Contribution à la connaissance du genre *Scutellinia* (Cooke) Lamb. emend. LE GAL (1ère étude). *Bull. Soc. myc. Fr.* 82: 301-334.
- MORAVEC J., 1971 — Some operculate Discomycetes from the park in Ilidza near Sarajevo (Yugoslavia). *Ces. Mykol.* 25: 197-202.
- MORAVEC J., 1974 — Several operculate Discomycetes from Greece and remarks on the genus *Scutellinia* (Cooke) Lamb. emend. *Le Gal. Ces. Mykol.* 28: 19-25.
- PARK J.Y. et AGNIHORTI V.P., 1969 — Sporophore production of *Agaricus bisporus* in aseptic environments. *Antonie van Leeuwenhoek* 35 : 523-528.

- TSANEK M., 1972 - Microorganisms inhabiting mushroom compost during fermentation. *Mushroom Sci.* 8: 797.
- SVRCEK M., 1971 - Techechoslowakische Arten der Diskomyzetengattung *Scutellinia* (Cooke) Lamb. emend Le Gal (Pezizales). *Ces. Mykol.* 25: 77-87.
- WITTMAN W., 1965 - Aceto-iron-haematoxylin-chloral hydrate for chromosome staining. *Stain technol.* 40: 161-164.